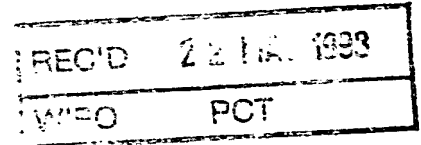


Helsinki 08.04.98

09/423004
PCT / F 198 / 00370

ETUOIKEUSTODISTUS
PRIORITY DOCUMENT



Hakija
Applicant

OY PANIMOLABORATORIO-
BRYGGERILABORATORIUM AB
Espoo

Patenttihakemus nro
Patent application no

971838

Tekemispäivä
Filing date

29.04.97

Kansainvälinen luokka
International class

C 12C

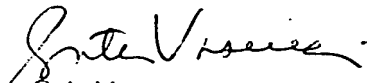
Keksinnön nimitys
Title of invention

"Menetelmä oluen kypsyttämiseksi"

PRIORITY DOCUMENT

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista ja tiivistelmästä.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the description, claims and abstract originally filed with the Finnish Patent Office.


Satu Väärä
Järjestelmä

Maksu 240,- mk
Fee 240,- FIM

Osoite: Arkadiankatu 6 A
Address: P.O.Box 1160
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

Puhelin: 09 6939 500
Telephone: + 358 9 6939 500

Telefax: 09 6939 5204
Telefax: + 358 9 6939 5204

MENETELMÄ OLUEN KYPSEYTTÄMISEKSI

Keksinnön kohteena on jatkuvatoiminen menetelmä oluen kypsyttämiseksi pääkäymisen jälkeen, jossa menetelmässä nuorolut johdetaan hiivan poiston ja kuumennuskäsittelyn jälkeen bioreaktoriin, joka on täytetty kantaja-aineella, johon hiiva on immobilisoitu. Keksinnön kohteena on myös jatkuvatoiminen kypsytyssreaktori, joka on pysty kolonnimainen läpivirtausreaktori, joka sisältää yhden tai useamman seulan, välipohjan tai laipan ja joka on täytetty kantaja-aineella, johon hiiva on immobilisoitu.

Oluen valmistus käsittää yleensä pääpiirteissään seuraavat vaiheet:

- viljan (yleensä ohran) mallastus idättämällä,
- mallastetun viljan rouhinta mallasrouheeksi,
- veden lisääminen mallasrouheeseen maskin muodostamiseksi,
- maskäys tärkkelyksen hajoittamiseksi käymiskelpoiseksi sokeriksi,
- muodostuneen vierteen erottaminen maskistä,
- vierteen keitto humalan kanssa maun ja tuoksun aikaansaamiseksi ja entsyymaattisen toiminnan lopettamiseksi,
- vierteen selkiytyys ja jäähdytys,
- vierteen käyttäminen hiivalla glukoosin ja maltoosin muuntamiseksi etanoliksi ja hiilidioksidiksi (pääkäyminen) nuoroluen muodostamiseksi,
- nuoroluen kypsyttäminen (jälkikäyminen) sekä
- oluen suodatus, stabilointi ja astiointi.

Oluen kypsyttäminen on tärkeä vaihe oluen kypsän ja tasaisen maun ja tuoksun (flavorin) muodostamiseksi.

Olutta kypsytetään perinteisesti varastoimalla nuorolutta pääkäymisen jälkeen useiden viikkojen ajan alhaisessa lämpötilassa. Tämä vaatii suuria varastointikustannuksia, josta syystä on kehitetty varastointia korvaava nopea jatkuvatoiminen menetelmä oluen kypsy-

tämiseksi. Tässä menetelmässä nuoroluesta poistetaan hiiva tavanomaisen pääkäymisen jälkeen, lämpökäsittelyään nuorolut (esim. 80 - 90 °C, 5 - 15 min) ja sen jälkeen kypsytetään olut jäähdytyksen jälkeen (esim. 10 - 15 °C) reaktorissa, jossa hiiva on immobilisoituna, kiinnitettynä kantaja-aineeseen. Lopuksi olut viimeistellään, eli stabiloidaan ja suodatetaan tavanomaiseen tapaan. Viipymäaika jatkuvatoimisessa reaktorissa on suuruusluokkaa esim. kaksi tuntia.

Lämpökäsittelyssä nuoroluen sisältämästä α -asetolaktaatista muodostuu diasetyyliä ja osittain myös asetoiinia. Diasetyyli maistuu oluessa jo pitoisuutena 0,05 mg/l ja sillä on voimakas imelä tai toffeemainen maku ja tuoksu, joka on tunnusomaista kypsymättömälle tai nuorelle oluelle. Reaktorissa hiiva pelkistää oluessa epämiellyttävän diasetyylin asetoiniksi. Samalla myös eräät muut karbonyyliyhdisteet pelkistyvät, ja oluesta tulee hyvän makuinen. Asetoiinin maku ja tuoksu on miedompi ja makukynnys, 50 - 1000 mg/l, huomattavasti korkeampi kuin diasetyylin.

Tunnettua tekniikan tasoa on kuvattu mm. seuraavissa artikkeleissa: European Brewery Conventionin Monografiassa XXIV, E.B.C.-Symposium Immobilized yeast applications in the brewing industry, Espoo, Finland October 1995 (ISBN 3-418-00749-X): E. Pajunen: Immobilized yeast lager beer maturation: DEAE-cellulose at Sinebrychoff (sivut 24-40) ja I. Hyttinen: Use of porous glass at Hartwall brewery in the maturation of beer with immobilized yeast (sivut 55-65). Edellisessä sovellutuksessa kantaja-aineena hiivan immobilisoinnissa on DEAE-selluloosa, johon on seostettu titaani-dioksidia ja polystyreeniä; patenttijulkaisussa US 4915959 kuvataan samaa sovellutusta. Jälkimmäisessä sovellutuksessa kantajana on huokoinen lasi. Myös hyvin vähän tai ei lainkaan alkoholia sisältävän oluen valmistuksessa on käytetty kolonnia, jossa hiiva on immobilisoituna DEAE-selluloosaan (H. Lommi: Immobili-

zed yeast for maturation and alcohol-free beer, Brewing and Distilling International, May 1990, s. 22-23).

5 Nämä sovellutukset toimivat teknillisesti hyvin, ja tuotetun oluen laatu on hyvä, samanlainen kuin perinteisellä tavalla kypsytetyn oluen. Ongelmana tunnetuissa sovellutuksissa on kuitenkin kantaja-aineiden kalleus. Kantaja-aineen hankinta on huomattava investointi, ja kalliin hinnan takia kantaja on tietyn
10 käyttöajan jälkeen regeneroitava uudelleen käytettäväksi.

Perinteisessä säiliössä tapahtuvassa kypsytyksessä varastosäiliöihin on lisätty melko suurikokoisia puuliuskoja, joiden pituus on esim. 400 - 500
15 mm ja leveys 40 - 50 mm. Näiden tarkoituksena on sitoa jonkin verran hiivaa ja edistää näin oluen selkiintymistä sekä jossain määrin jälkikäymistä. Kysymyksessä on tavanomainen hidas panosprosessi. Eräät panimot käyttävät tällaista menettelyä edelleen, lähinnä perinteen jatkamiseksi.
20

Etyylialkoholin tuotannon yhteydessä jatkuva-toimisella käymisprosessilla hiivan immobilisointiin on käytetty puukappaleita, esim. pyökkiä (M. Moo-Young, J. Lamptey ja C.W. Robinson: Immobilization of
25 yeast cells on various supports for ethanol production, Biotechnology Letters 2 (1980) No. 12, s. 541-545) ja koivua (M.A. Gencer ja R. Mutharasan: Ethanol fermentation in a yeast immobilized tubular fermentor, Biotechnology and Bioengineering 25 (1983) 2243-2262).
30 Etyylialkoholin tuotto poikkeaa kuitenkin täysin oluen valmistuksesta: edellisessä on tavoitteena ainoastaan mahdollisimman tehokas käymisprosessi, jälkimmäisessä on ensisijaista toivotun hyvän maun ja tuoksun kehittäminen käymisprosessin yhteydessä.

35 Oluen valmistuksessa on pienessä mittakaavassa kokeiltu myös puulastuja pääkäymisen yhteydessä hiivan immobilisointiin: J. Kronlöf ja V.-P. Määttä:

Pääkäyminen oluen valmistuksessa immobilisoidun hiivan avulla, Mallias ja Olut 1993, No 5, s. 133-147.

Keksinnön tarkoituksena on poistaa edellä mainitut epäkohdat.

5 Keksinnön tarkoituksena on tuoda esiin nopea, jatkuvatoiminen oluen kypsytysmenetelmä, jossa kantaja-aineeseen immobilisoitu hiiva pienentää diasetyylin pitoisuuden tehokkaasti alle hyväksyttävissä olevan makukynnyksen ja joka soveltuu käytettäväksi tunnettu-

10 jen oluen valmistusmenetelmien yhteydessä nuoroluen kypsyttämiseen.

Edelleen keksinnön tarkoituksena on tuoda esiin nopea, jatkuvatoiminen oluen kypsytysmenetelmä, jossa hiivan kantaja-aineena käytetään hinnaltaan

15 edullista ja riskitöntä kantaja-ainetta.

Lisäksi keksinnön tarkoituksena on tuoda esiin jatkuvatoiminen kypsytyksreaktori menetelmän toteuttamiseksi.

Keksinnön mukaiselle oluen kypsytysmenetelmälle on tunnusomaista se, mitä on esitetty patenttivaatimuksessa 1.

20

Keksinnön mukaiselle kypsytyksreaktorille on tunnusomaista se, mitä on esitetty patenttivaatimuksessa 13.

25 Keksintö perustuu suoritettuun tutkimustyöhön, jonka tarkoituksena oli soveltaa hiivan immobilisointitekniikkaa oluen jälkikäymiseen ja kypsyttämiseen. Tässä yhteydessä havaittiin yllättäen, että puupartikkelit soveltuvat erinomaisen hyvin käytettäväksi

30 kantaja-aineena hiivan immobilisoinnin yhteydessä.

Keksinnön mukaisessa jatkuvatoimisessa oluen kypsytysmenetelmässä nuorolut johdetaan hiivan poiston ja kuumennuskäsittelyn jälkeen bioreaktoriin, joka on täytetty pääasiassa puupartikkeleilla, joihin on immobilisoitu hiivaa. Keksinnön mukaisen menetelmän toimintaperiaate on sama kuin teollisuudessa käytettävien

35 menetelmien, joissa kantaja-aineena on DEAE-selluloosa

tai huokoinen lasi. Hiivan poisto ja muut jälkikäsitelyvaiheet toteutetaan kuten tunnetuissa menetelmissä.

Keksinnön mukainen menetelmä soveltuu erilaisten oluiden, so. pohjahiiwaoluiden sekä pintahiiwaoluiden valmistukseen. Oluiden raaka-aineiksi sopivat mallas sekä muut oluen valmistuksen yhteydessä tunnetut maltaita korvaavat tärkkelys- ja sokerilähteet. Valmistettavien oluiden alkoholipitoisuudet ovat välillä 0 - 10 % ja kantavierrepitoisuus 5 - 20 %, jopa korkeampi, aina 30 % asti.

Menetelmässä kantaja-aine voi muodostua minkä kokoisista ja muotoisista puupartikkeleista tahansa, edullisesti melko pieniksi, suunnilleen tasakokoisiksi lastuiksi, tikuiksi tai minkä tahansa säännöllisen tai epäsäännöllisen kappaleen muotoisiksi pilkotuista partikkeleista. Partikkeleiden suurin dimensio on pääasiassa 1 - 100 mm, edullisesti 1 - 50 mm ja edullisimmin 2 - 20 mm.

Käytettävien puupartikkeleiden valmistukseen voidaan käyttää mitä tahansa lehtipuuta, esimerkiksi haapaa, pyökkiä tai muuta vastaavaa. Partikkelit voidaan valmistaa myös havupuusta. Käytettävä puulaji voidaan valita siten, että sen sisältämät aromiaineet vaikuttavat valmistettavan oluen makuun ja tuoksuun halutulla tavalla.

Jatkuvatoimisessa reaktorissa osa hiivasta on immobilisoituneena kantajaan ja osa voi olla vapaasti suspendoituneena. Tavanomaiset tunnetut panimohiivat soveltuvat hyvin käytettäväksi tällaisessa reaktorissa. Voimakkaasti flokkuloituvilla hiivoilla saavutetaan kuitenkin nopeasti korkea hiivapitoisuus reaktorissa ja hiivapitoisuus pysyy myös korkeana tehostaen reaktorin toimintaa.

Hiivan immobilisointi voidaan toteuttaa millä tahansa sinänsä tunnetulla tavalla, esim. kuten patenttijulkaisussa US 4915959 on kuvattu.

Immobilisoidun hiivan määrä reaktorissa voi vaihdella kuten alalla tunnetaan ja on edullisesti 10^6 - 10^9 hiivasolua/ 1 cm^3 täytekappalepartikkeleita. Hiivalla immobilisoitujen puupartikkelien käyttöikä on
 5 muutama kuukausi, esim. 1 - 6 kk, jopa pitempi aina 1 v saakka tai sen yli.

Nuoroluen virtausnopeus reaktorin läpi ja viipymäaika reaktorissa vaikuttaa oluen diasetyyli-
 10 toisuuteen. Nuoroluen virtausnopeus säädetään sellaiseksi, että riittävä määrä diasetyyliä pelkistyy reaktorissa asetoikiniksi, jolloin diasetyylin pitoisuus valmiissa oluessa ei ylitä hyväksyttävää makukynnystä. Nuoroluen virtausnopeus reaktorin läpi voi olla 0,05 -
 2 reaktoritilavuutta/h. Edullinen nuoroluen virtausno-
 15 peus on suuruusluokkaa 0,5 - 1 reaktoritilavuutta/h. Lämpötila reaktorissa on 5 - 25 °C, edullisesti 5 - 20 °C. Korkeampaakin lämpötilaa voidaan käyttää.

Kypsytyksreaktori voi olla paineistettu, jotta oluen hiilidioksidi pysyisi liuenneena reaktorissa.
 20 Vapaa hiilidioksidi saattaa haitata reaktorin toimintaa. Käyttöpaine voidaan valita lämpötilan, halutun maun ja oluen laadun mukaan.

Kypsyttämisen jälkeen olut voidaan jäähdyttää haluttuun stabilointilämpötilaan ja oluen jälkikäsit-
 25 tely, kuten stabilointi, suodatus ja astiointi, voidaan toteuttaa sinänsä tunnettuun tapaan.

Täyteaineena käytettävät puupartikkelit voivat edullisen hintansa vuoksi olla kertakäyttöisiä. Puupartikkeliden hävittäminen on helppoa ja riskitön-
 30 tä. Täyteaine voidaan myös regeneroida käytön jälkeen, esimerkiksi kuumalla vedellä, höyryttämällä, pesulla tai muulla sopivalla käsittelyllä.

Täyteaineena käytettävät puupartikkelit voidaan haluttaessa käsitellä etukäteen, ennen immobili-
 35 sointia. Puupartikkelit voidaan esim. pestä tai käsitellä muulla halutulla tavalla.

Keksinnön mukainen jatkuvatoiminen kypsytyks-

reaktori on pysty kolonni, jossa läpivirtaus tapahtuu alhaalta ylös tai ylhäältä alas. Reaktorin halkaisija on suuruusluokkaa $1,5 \pm 1 - 2,5 \pm 1$ m ja korkeus suuruusluokkaa 2,5 - 10 m. Kolonni voi olla varustettu yhdellä tai useammalla seulalla, välipohjalla tai laipalla, joilla estetään puutäytekkappaleiden poistuminen. Kolonni on täytetty pääasiassa puupartikkeleilla, joihin hiiva on immobilisoitu.

Keksinnön etu aikaisempaan tekniikkaan verrattuna perustuu olennaisesti halvempaan kantajamateriaaliin, jolla päästään samaan lopputulokseen kuin kalliilla kantajilla.

Puupartikkeleiden halpa hinta tekee myös regeneroinnin tarpeettomaksi. Kalliita kantajia käytettäessä regenerointi on välttämätöntä kantajan käyttöiän pidentämiseksi. Regenerointi aiheuttaa suoria ja epäsuoria lisäkustannuksia.

Puun etuna on myös se, että luonnonmateriaalina siihen ei liity riskejä.

Seuraavassa keksintöä kuvataan yksityiskohdaisemmin oheisissa esimerkeissä.

ESIMERKKI 1

Koejärjestelyt:

Räuchergold KL1-4 pyökkilastut (5 litraa) keitettiin ionivaihdetussa vedessä (5,5 litraa) tunnin ajan. Vesi poistettiin ja lastuja keitettiin 4 tunnin ajan 10 tilavuusprosenttisessa etanolissa. Alkoholi-liuos poistettiin ja lopuksi lastuja keitettiin 1 tunti ionivaihdetussa vedessä.

Reaktori täytettiin 5,1 litran merkkiin asti märillä lastuilla. Reaktori koottiin ja autoklavoitiin $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 21 minuuttia yhteineen ja letkuineen. Jäähdytyksen jälkeen reaktoriin pumpattiin letkupumpulla 3 litraa hiivasuspensiota 6 tunnissa. Reaktoriin syötettiin ilmaa noin 50 ml/min ja vierrettä 100 ml/h yön yli $20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Tämän jälkeen syötöt lopetettiin ja reaktori siirrettiin $10\text{ }^{\circ}\text{C}$:een.

Prosessiin syötettävänä nuoroluenä käytettiin immobilisoidussa pääkäymisessä syntynyttä nuorolutta, jossa visinaalisten diketonien kokonaispitoisuus oli noin 0,8 - 0,3 mg/ml. Pääkäymisen jälkeen nuorolut
 5 suodatettiin Seitz K -suodatinpaperin lävitse autoklavoituun (121 °C, 20 min) 50 litran ravintola-astiaan, joka toimi jälkikäymisreaktorin syöttöastiana.

Prosessin kuvaus:

Prosessi käsittää nuoroluen lämpökäsittelyn, jähdytyksen 10 °C:een, jälkikäymisen (kypsytyksen)
 10 immobilisoidulla hiivalla ja tuotteen vastaanoton.

Syöttöastiasta nuorolut pumpataan lämpökäsittelyyn kalvopumpulla (Prominent Mini Gamma). Lämpökäsittely (80 °C, noin 60 min) tapahtuu ohutseinäisessä
 15 metallisessa viipymäputkessa, joka on 80 °C:ssa vesihauteessa. Lämpökäsittelystä poistuva olut virtaa lasiseen jähdytysvaippaan, missä se jäähtyy jälkikäymislämpötilaan 10 °C. Jäähtynyt olut virtaa reaktorin läpi alhaalta ylös. Reaktorin yläosasta olut virtaa
 20 erotussuppilon kautta vastaanottoastiaan. Vastaanottoastiana toimii 50 litran ravintola-astia.

Analyysit:

Syötettävästä nuoroluesta, lämpökäsitellystä nuoroluesta ja jälkikäytetystä oluesta analysoitiin
 25 visinaalisten diketonien kokonaismäärä (kokonais-VDK), vapaat diketonit (vapaa-VDK), aromiaineet ja näennäinen uutepitoisuus. Virtausnopeuden perusteella arvioitiin viipymäaika reaktorissa. Lisäksi oluen väri analysoitiin 2 kertaa koejakson aikana.

30 Tulokset:

Viipymäajat reaktorissa on esitetty taulukossa 1. Reaktorin ollessa täytettynä 5,1 litran merkkiin asti nestetilavuus reaktorissa oli 3,6 litraa. Tällöin ei otettu huomioon lastujen sisäistä nestemäärää, joka
 35 on erittäin vähäinen lastujen ollessa koko ajan märkiä, eikä lastujen pintaan jäänyttä nestemäärää.

Taulukko 1.

Virtaus- nopeus	Viipymäaika katajamateriaali- tilavuutta kohti	Nestemäärän mukainen viipymäaika	Lämpökäsit- telyaika
ml/h	h/kantajatilavuus	h	min
200	25,5	18,0	65
300	17,0	12,0	43
400	12,8	9,0	32

Taulukoissa 2 - 4 on esitetty visinaalisten diketonien konversiot eri virtausnopeuksilla.

5

Taulukko 2. Visinaalisten diketonien pitoisuudet (mg/dm³) ja konversio (%) virtausnopeudella 200 ml/h.

1. määrittyskerta	Syöttö	Lämpökä- sitelty	Jälki- käytetty	Konver- sio
kokonaisdiasetyyli	0,77	0,70	0,02	97,4
vapaa diasetyyli	0,54	0,75	0,02	96,3
kokonaispentaanidioni	0,20	0,18	0,01	95,0
vapaa pentaanidioni	0,14	0,17	0,00	100,0
kokonais-VDK	0,97	0,98	0,03	96,9
2. määrittyskerta				
kokonaisdiasetyyli	0,41	0,39	0,02	95,1
vapaa diasetyyli	0,23	0,36	<0,01	
kokonaispentaanidioni	0,13	0,11	<0,01	
vapaa pentaanidioni	0,08	0,10	<0,01	
kokonais-VDK	0,54	0,50	<0,03	
3. määrittyskerta				
kokonaisdiasetyyli	0,21	0,22	0,02	90,5
vapaa diasetyyli	0,16	0,22	<0,01	
kokonaispentaanidioni	0,11	0,11	<0,01	
vapaa pentaanidioni	0,07	0,10	<0,01	
kokonais-VDK	0,32	0,33	<0,03	90,6

Taulukko 3. Visinaalisten diketonien pitoisuudet (mg/dm^3) ja konversio (%) virtausnopeudella 300 ml/h.

1. määrittyskerta	Syöttö	Lämpökä- sitelty	Jälki- käytetty	Konver- sio
kokonaisdiasetyyli	0,28	0,27	0,01	96,4
vapaa diasetyyli	0,17	0,27	0,01	94,1
kokonaispentaanidioni	0,14	0,13	0,01	92,9
vapaa pentaanidioni	0,07	0,12	<0,01	
kokonais-VDK	0,42	0,40	0,02	95,2
2. määrittyskerta				
kokonaisdiasetyyli	0,39	0,37	0,02	94,9
vapaa diasetyyli	0,23	0,39	0,02	91,3
kokonaispentaanidioni	0,22	0,19	0,01	95,4
vapaa pentaanidioni	0,11	0,18	<0,01	
kokonais-VDK	0,61	0,56	0,03	95,1

5 Taulukko 4. Visinaalisten diketonien pitoisuudet (mg/dm^3) ja konversio (%) virtausnopeudella 400 ml/h.

	Syöttö	Lämpökä- sitelty	Jälki- käytetty	Konver- sio
kokonaisdiasetyyli	0,46	0,41	0,07	84,8
vapaa diasetyyli	0,27	0,38	0,06	77,8
kokonaispentaanidioni	0,19	0,16	0,01	94,7
vapaa pentaanidioni	0,09	0,14	0,01	88,9
kokonais-VDK	0,65	0,57	0,08	87,7

10 Aromiaineiden keskimääräiset muutokset prosessissa (prosentteina lähtöarvosta) on esitetty taulukossa 5. Taulukosta 5 nähdään, että vain asetaldehydin pitoisuus on muuttunut merkittävästi prosessin aikana. Tämä muutos on itseasiassa edullinen, sillä liian suuri asetaldehydipitoisuus antaa oluelle liuotinmaisen flavorin. Tulokset ovat keskiarvoja yhteensä kolmesta määrittäyksestä eri virtausnopeuksilla.

Taulukko 5.

	Syöttö	Lämpökä- sitelty	Jälki- käytetty
Aromiaine	%	%	%
etyyliasettaatti	100	97	99
3-metyyllibutyliase- taatti	100	69	80
propanoli	100	101	102
2-metyyllipropanoli	100	100	102
3-metyyllipropanoli	100	99	101
2-metyyllibutanoli	100	99	101
asetaldehydi	100	103	68

5 Näennäisen uutepitoisuuden ja värin määrittys-
tulokset on esitetty taulukossa 6. Näennäinen uutepi-
toisuus ja oluen väri määritettiin 2 kertaa koejakson
aikana. Näin varmistuttiin, ettei käymisessä tapahtu-
nut muutoksia ja ettei tummahko puu antanut väriä olu-
een.

10 Taulukko 6.

	Syöttö	Lämpökä- sitelty	Jälki- käytetty
uutepitoisuus 200 ml/h [%]	2,28	2,26	2,22
uutepitoisuus 300 ml/h [%]	1,91	1,98	1,98
väri 200 ml/h [EBC]	26	28	26
väri 300 ml/h [EBC]	22	23	22

15 Keksintöä ei rajata pelkästään edellä esitet-
tyjä sovellutusesimerkkejä koskevaksi, vaan monet
muunnokset ovat mahdollisia pysyttäessä patenttivaati-
musten määrittelemän keksinnöllisen ajatuksen puit-
teissa.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Jatkuvatoiminen menetelmä oluen kypsyttämiseksi pääkäymisen jälkeen, jossa menetelmässä nuorolut johdetaan hiivan poiston ja kuumennuskäsittelyn jälkeen bioreaktoriin, joka on täytetty kantaja-
5 aineella, johon hiiva on immobilisoitu, tunnettu siitä, että kantaja-aine koostuu pääasiassa puupartikkeleista.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
10 tunnettu siitä, että puupartikkelit ovat lastumaisia, tikkumaisia tai minkä tahansa säännöllisen tai epäsäännöllisen kappaleen muotoisia partikkeleita, joiden dimensio on suuruusluokkaa pääasiassa 1 - 100 mm, edullisesti 1 - 50 mm, edullisemmin 2 - 20 mm.

3. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että puupartikkelit on valmistettu lehtipuusta.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että puupartikkelit on valmistettu havupuusta.
20

5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että reaktorissa käytetään tavanomaista panimohiivaa ja/tai voimakkaasti flokkuloituvaa hiivaa.

6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että reaktorissa on hiivaa 10^6 - 10^9 solua/1 cm³ puupartikkelia kohti.
25

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 6 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että lämpötila reaktorissa on 5 - 25 °C, edullisesti 5 - 20 °C.
30

8. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että nuoroluen virtausnopeus reaktorin läpi on suuruusluokkaa 0,05 - 2 reaktoritilavuutta/h, edullisesti 0,5 - 1 reaktoritilavuutta/h.
35

9. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 8 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että puupartikke-

lit regeneroidaan, edullisesti kuumalla vedellä tai höyryllä.

10. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 9 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että puupartikkeleita käsitellään ennen immobilisointia, edullisesti vesikeitolla ja etanoliuutolla.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että puupartikkelit pestään.

10 12. Jatkuvatoiminen oluen kypsytyksreaktori, joka on pysty, kolonnimainen läpivirtausreaktori, joka sisältää yhden tai useamman seulan, välipohjan tai lainpan ja joka on täytetty kantaja-aineella, johon hiiva on immobilisoitu, tunnettu siitä, että kantaja-aine koostuu pääasiassa puupartikkeleista.

15 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen kypsytyksreaktori, tunnettu siitä, että puupartikkelit ovat lastumaisia, tikkumaisia tai yleensä minkä tahansa säännöllisen tai epäsäännöllisen kappaleen muotoisia partikkeleita, joiden dimensio on suuruusluokkaa
20 pääasiassa 1 - 100 mm, edullisesti 1 - 50 mm.

(57) TIIVISTELMÄ

Keksinnön kohteena on jatkuva-toiminen menetelmä oluen kypsyttämiseksi pääkäymisen jälkeen, jossa menetelmässä nuorolut johdetaan hiivan poiston ja kuumennuskäsittelyn jälkeen bioreaktoriin, joka on täytetty kantaja-aineella, johon hiiva on immobilisoitu, jolloin kantaja-aine koostuu pääasiassa puupartikkeleista. Keksinnön kohteena on myös jatkuvatoiminen kypsytysreaktori, joka on pysty kolonnimainen läpivirtausreaktori, joka sisältää yhden tai useamman seulan, välipohjan tai laipan ja joka on täytetty pääasiassa puupartikkeleista muodostuvasta kantaja-aineesta, johon hiiva on immobilisoitu.

Helsinki 18.05.98

ETUOIKEUSTODISTUS
PRIORITY DOCUMENT



Hakija
Applicant

VALIO OY
Helsinki

REC'D 15 JUN 1998

WIPO PCT

Patenttihakemus nro
Patent application no

971872

Tekemispäivä
Filing date

30.04.97

Kansainvälinen luokka
International class


A 23J

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet ja näiden valmistus"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista, tiivistelmästä ja piirustuksista.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the description, claims, abstract and drawings originally filed with the Finnish Patent Office.


Satu Vasenius
johtaja/manager

PRIORITY DOCUMENT

Maksu 270,- mk
Fee 270,- FIM

Osoite: Arkadiankatu 6 A
Address: P.O.Box 1160
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

Puhelin: 09 6939 500
Telephone: + 358 9 6939 500

Telefax: 09 6939 5204
Telefax: + 358 9 6939 5204

Proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet ja näiden valmistus

5 Keksinnön kohteena ovat proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet ja näiden valmistus. Erityisesti keksinnön kohteena ovat oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus ja sen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet, kuten
10 oleellisesti insuliinittomat äidinmaidonkorvikkeet ja muut erityisravintovalmisteet, ja näiden valmistus.

 Nuoruusiän diabetes eli insuliininpuutoksesta johtuva diabetes mellitus (IDDM) on sairaus, jossa haiman Langerhansin saarekkeiden insuliinia tuottavat beeta-solut ovat tuhoutuneet, mutta saarekkeiden muut solut säilyvät
15 vahingoittumattomina. Kyseinen sairaus puhkeaa yleensä viimeistään lapsuusiässä.

 Lukuisista lääketieteellisistä tutkimuksista huolimatta ei vielä tarkasti tiedetä, mitkä tekijät aiheuttavat nuoruusiän diabeteksen puhkeamisen. Tällä hetkellä kuitenkin uskotaan, että lasten riskiin sairastua nuoruusiän diabetekseen vaikuttavat sekä perintötekijät että ympäristötekijät, kuten ravinto.
20

 Useissa epidemiologisissa tutkimuksissa on mm. todettu, että altistuminen lehmänmaidon proteiineille imeväisaikana lisää riskiä sairastua nuoruusiän diabetekseen (Gerstein, Diabetes Care 17 (1994) 13 - 19). Epidemiologisten havaintojen perusteella on esitetty useita hypoteeseja mekanismeista, miten lehmän maidon proteiinit voisivat toimia diabetogeenisinä tekijöinä. On todettu, että
25 immuunivaste naudan seerumialbumiinia (Karjalainen et al., N. Engl. J. Med. 327 (1992) 302-307), beeta-laktoglobuliinia (Vaarala et al., Diabetes 45 (1996) 178-182) tai beeta-kaseiinia (Cavallo et al., Lancet 348 (1996) 926-28) kohtaan voisi johtaa beeta-solureaktiivisuuteen, mutta
30 tähän mennessä naudan insuliinin ei ole edes epäilty olevan diabetogeeninen riskitekijä.
35

Lehmänmaidon tiedetään normaalisti sisältävän pieniä määriä naudän insuliinia. Kirjallisuudessa ilmoitettu maidon insuliinipitoisuus vaihtelee määritysmenetelmästä riippuen, mutta esimerkiksi ELISA-menetelmällä on todettu noin 50 ng/ml pitoisuuksia. Maidon insuliinipitoisuus on suurimmillaan (noin 330 ng/ml) heti poikimisen jälkeen, minkä jälkeen pitoisuus alenee saavuttaen vakiotason (noin 46 ng/ml) noin 7 päivän kuluttua poikimisesta (Aranda et al., J. Dairy Sci. 74 (12) (1991) 4320 - 4325).

Hakija on tutkimuksissaan todennut, että tavanomaisen lehmänmaitopohjaisen äidinmaidonkorvikkeen antaminen imeväisikäisille saa aikaan vasta-aineiden, kuten insuliinivasta-aineiden, tuotannon naudän insuliinia kohtaan. Tavanomaista lehmänmaitopohjaista äidinmaidonkorviketta (Enfamil[®]) lisäruokintana saaneiden 6 kuukauden ikäisten lasten ja toisaalta yksinomaan rintamaitoa saaneiden samanikäisten lasten IgG-luokan vasta-ainepitoisuudet naudän insuliinia kohtaan on esitetty kuvassa 1. Nämä vasta-aineet ristireagoivat humaani-insuliinin kanssa.

Koska insuliiniautovasta-aineiden (IAA):n esiintyminen edeltää ja ennustaa IDDM:n puhkeamista, immunisointuminen naudän insuliinille lehmänmaitopohjaisista tuotteista voi olla haitallista ja lisätä riskiä sairastua IDDM:ään. Tästä syystä on tarve saada markkinoille lehmänmaitotuotteita ja lehmänmaitopohjaisia tuotteita, jotka eivät sisällä immunoreaktiivista naudän insuliinia.

Insuliinin puhdistuksessa tuotanto- ja uuttoliuokista on perinteisesti käytetty nestekromatografiaa ja käänteisfaasikolonnia (Kroeff et al., J. Chromatogr. 461 (1989) 45 - 61; Poll et al., J. Chromatogr. 539 (1991) 37 - 45; Cox, J. Chromatogr. 599 (1992) 195 - 203; Welinder, J. Chromatogr. 542 (1991) 83 - 99), geelisuodatus- tai anioninvaihtokolonnia (WO 90/00176 ja WO 90/00177) tai heikkoa kationinvaihtokolonnia (DE 3511270 A1 ja GB 2173503 A). Käänteisfaasi- tai geelisuodatuskromatografia

eivät sellaisenaan sovi maidon käsittelyyn, koska käsittelyn maidon tulisi olla elintarvikekelpoista ja kohtuullisen hintaista.

5 Missään hakijan tuntemassa tunnetun tekniikan mukaisessa julkaisussa ei kuitenkaan ole esitetty eikä edes ehdotettu lehmänmaidossa läsnäolevan naudan insuliinin eristämistä tai poistamista.

10 Hakija on nyt keksinyt, miten lehmänmaidosta saadaan kohtuullisin kustannuksin elintarvikekelpoinen proteiinikoostumus, joka on oleellisesti naudaninsuliiniton ja joka sellaisenaan sopii erityisesti äidinmaidonkorvikkeen, mutta myös muiden erityisravintovalmisteiden proteiiniosaksi.

15 Keksinnön kohteena on siten oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus, jolle on tunnusomaista, että se on valmistettu lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvattomasta maidosta tai kaseiiniliuoksesta.

20 Kun maidosta poistetaan rasva ja kaseiini, saadaan hera, joka sisältää heraproteiinit. Maidon kokonaisproteiinista noin 20 prosenttia on heraproteiineja ja loput kaseiinia. Juustonvalmistuksen yhteydessä saatavaa herää kutsutaan juustoheraksi ja kaseiininvalmistuksen yhteydessä saatavaa herää puolestaan kutsutaan kaseiiniheraksi.

25 Keksinnössä käytettävä hera voi olla mikä tahansa lehmänmaidosta peräisin oleva hera, kuten esimerkiksi juustohera, juoksetekaseiinihera, happokaseiinihera tai hapan juustohera. Edullisesti hera on juustohera.

30 Heran lisäksi keksinnössä voidaan käyttää lehmänmaidosta peräisin olevana rasvattomana proteiinipitoisena materiaalina rasvatonta maitoa tai rasvattomasta maitojauheesta tehtyä vesiliuosta tai maidon kaseiinista tehtyä vesiliuosta, ts. kaseiiniliuosta.

35 Keksinnön mukainen oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus voidaan sopivasti valmistaa keksinnön mukai-

sella menetelmällä, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että

a) lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali johdetaan insuliininpoistokäsittelyyn,

b) vaiheessa a) saatu nestemäinen proteiinipitoinen materiaali

konsentroidaan ultra- ja diasuodattamalla käyttäen kalvoja, jotka ovat 6 000 - 20 000 D cut-off -kalvoja,

saatu proteiinikonsentraatti haihdutetaan ja kuivataan proteiinijauheeksi,

c) mahdollisesti

1) vaiheessa b) saadusta proteiinikonsentraatista tai proteiinijauheesta muodostetaan veteen liuos, jonka proteiinipitoisuus on 1 - 20 %,

2) vaiheessa c1) saatu proteiiniliuos hydrolysoidaan entsymaattisesti proteaaseilla ja

3) vaiheessa c2) hydrolysoitu proteiiniliuos ultrasuodatetaan, ja

d) mahdollisesti johdetaan vaiheessa c) saatu proteiinihydrolysaatti hydrofobiseen kromatografiakäsittelyyn ja

e) vaiheessa c) tai d) saatu liuos haihdutetaan ja kuivataan jauheeksi.

Vaiheessa a) lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasvaton proteiinipitoinen materiaali johdetaan insuliininpoistokäsittelyyn, jolloin oleellisesti kaikki tai ainakin merkittävä osa kyseisessä materiaalissa olevasta naudan insuliinista saadaan poistettua. Insuliininpoistossa kyseistä lehmänmaidosta peräisin olevaa nestemäistä materiaalia voidaan käsitellä vahvalla kationinvaihtohartsilla tai se voidaan kirkastaa esimerkiksi mikrosuodattamalla tai sentrifugoimalla. Hera voidaan tässä vaiheessa kirkastaa myös ultrasuodattamalla.

Parhaat insuliininpoistotulokset saadaan kuitenkin silloin kun puhdistettava materiaali ensin kirkastetaan edellä mainitulla tavalla ja sen jälkeen sitä käsitellään vahvalla kationinvaihtohartsilla.

5 Hera, kuten juusto- tai kaseiinihera on edullisinta puhdistaa naudan insuliinista vahvalla kationinvaihtohartsilla. Sopivia kationinvaihtohartseja ovat esimerkiksi Amberlite C-20 (Rohm & Haas, Ranska) ja Spherosil S. (Rhone-Poulenc, Ranska) Puhdistettava hera, jonka pH on las-
 10 kettu arvoon 5,2 - 5,6 elintarvikelaatuisella hapolla, esimerkiksi HCl:lla, tai ioninvaihdolla, johdetaan 3 - 65 °C:ssa sopivasti huoneenlämpötilassa Na⁺- tai K⁺-muotoon regeneroidulla vahvalla kationinvaihtohartsilla täytetyn pylvään läpi. Panosprosessissa syöttönopeus ja -tilavuus
 15 voivat vaihdella, mutta sopivasti syöttönopeus on 1 - 10 pylvääntilavuutta (BV) / h ja syöttötilavuus on 5 - 60 BV, edullisesti 20 BV. pH-alueella 5,2 - 5,6 heran proteiinit ovat yleensä negatiivisesti varautuneita, mutta insuliini on positiivisesti varautunut, sillä sen isoelektrinen piste on 5,6 (Erkama, Biokemia, s. 185). Tällöin ainakin
 20 oleellinen osa herassa olevasta naudan insuliinista sitoutuu kationinvaihtohartsiin negatiivisesti varautuneiden heraproteiinien mennessä pylvään läpi.

Edullisesti hera puhdistetaan naudan insuliinista
 25 vahvalla kationinvaihtohartsilla pH:ssa 5,4.

Vahvalla kationinvaihtohartsilla puhdistetussa herassa ei todettu lainkaan naudan insuliinia electro spray-massaspektrometrillä.

30 Myös rasvattoman lehmänmaidon ja maidon kaseiinista tehdyn vesiliuoksen, ts. kaseiiniliuoksen naudaninsuliinipitoisuutta voidaan alentaa merkittävästi vastaavalla käsittelyllä vahvalla kationinvaihtohartsilla. Tällöin kaseiiniliuoksen insuliinipitoisuus alenee ainakin noin 65 % ja rasvattoman maidon insuliinipitoisuus puolestaan alenee
 35 ainakin noin 40 %.

Insuliini analysoitiin näytteistä electro spray-massaspektrometrillä (VG Quattro II, VG BioTech, Altrincham, Englanti) käyttäen esikäsittelynä fraktiointia nestekromatografian (Hewlett Packard HPLC 1090, Hewlett Packard Co. Saksa) C18-käänteisfaasikolonnilla (eluentit: A: 0,05 % trifluorietikkahappo (TFA) vedessä, B: asetonitriili (Acn) + 0,05 % TFA, gradientti: 15 % -> 40 % 20 min:ssa, 40 % -> 100 % 10 min:ssa). Insuliinia sisältävä fraktio pakkaskuivattiin, liuotettiin uudelleen konsentroiduksi liuokseksi ja johdettiin massaspektrometriin.

Heraa voidaan puhdistaa naudan insuliinista kirkastamalla hera esimerkiksi mikrosuodattamalla, ultrasuodattamalla tai sentrifugoimalla, jolloin herasta saadaan pois jäännöskaseiini ja muut suurimolekyylliset proteiinit, joihin insuliini hydrofobisena proteiinina on sitoutunut.

Mikrosuodatuksessa puhdistettava hera johdetaan sopivasti 10 - 60 °C:ssa mikrosuodatuskalvojen läpi, jotka kalvot ovat 0,05 - 1,4 mikrometrin kalvoja, edullisesti 0,1 mikrometrin kalvoja.

Ultrasuodatuksessa puhdistettava hera puolestaan käsitellään ultrasuodatuskalvoilla, jotka edullisesti ovat kalvoja, joiden cut-off -arvo on 50 000 - 200 000 Daltonia.

Sentrifugoinnissa heraa käsitellään edullisesti nopeudella 1 000 - 10 000 kierrosta / min.

Kirkastuskäsittely alentaa heran naudaninsuliinipitoisuutta 6 - 10 %.

Kirkastuskäsittely ja kationinvaihtohartsikäsittely alentavat molemmat käsiteltävän, lehmänmaidosta peräisin olevan materiaalin naudan insuliinipitoisuutta, mutta parhaat tulokset saadaan kun kyseinen materiaali ensin kirkastetaan ja sen jälkeen johdetaan kationinvaihtohartsikäsittelyyn. Parhaat tulokset saadaan heran käsittelyssä, jolloin edullisin kirkastusmenettely on mikrosuodatus.

Vaiheessa a) naudan insuliinista puhdistettu proteiinipitoinen materiaali, edullisesti hera konsentroidaan ultra- ja diasuodatuksella riittävän proteiinipitoisuuden aikaansaamiseksi, minkä jälkeen näin saatu proteiinikonsentraatti haihdutetaan ja mahdollisesti kuivataan proteiinijauheeksi. Tällöin naudan insuliinista ainakin merkittävästi puhdistettu materiaali, kuten hera, jonka materiaalin pH on säädetty arvoon noin 6,5 elintarvikelaatuisella emäksellä, esimerkiksi NaOH:lla tai $\text{Ca}(\text{OH})_2$:lla, tai ioninvaihdolla, johdetaan ultra- ja diasuodatukseen, jolloin puoliläpäisevän kalvon avulla suurempimolekyyliset proteiinit saadaan eroon laktoosista, suoloista ja pienempimolekyylisistä proteiineista, kuten insuliinista, jonka molekyylipaino on noin 5734 D. Puoliläpäisevän kalvon cut off -arvo on sopivasti 6 000 - 20 000 D, edullisesti 10 000 D ja puoliläpäisevänä kalvona voidaan käyttää esimerkiksi polyeetterisulfonikalvoa, jonka cut off -arvo on 10 000 D.

Vaiheessa a) saatu hera voidaan konsentroida kokonaiskonsentrintisuhteella, joka sopivasti on noin 120. Tällöin vaiheessa a) käsitelty hera ultrasuodatetaan edullisesti 10 000 D cut off -kalvoilla ensin esimerkiksi konsentrintisuhteella 10, minkä jälkeen retentaatti laimennetaan lähtötilavuuteen ja suodatetaan uudelleen suhteella 12, jolloin kokonaiskonsentrintisuhteeksi tulee 120. Näin saatu heraproteiinikonsentraatti, jonka proteiinipitoisuus on noin 90 % kuiva-aineesta, haihdutetaan ja kuivataan jauheeksi esimerkiksi sumutuskuivauksella tai pakkas-kuivauksella.

Perinteisesti ultra- ja diasuodatettu heraproteiinijauhe, jonka proteiinipitoisuus on 70 - 80 %, sisältää 43 - 48 mikrogrammaa insuliinia / gramma jauhetta (noin 60 mikrogrammaa insuliinia / gramma proteiinia).

Sitä vastoin keksinnön mukaisen menetelmän vaiheiden a) ja b) mukaisesti saatu heraproteiinijauhe sisältää

merkittävästi vähemmin naudan insuliinia kuin edellä mainittu perinteisesti ultra- ja diasuodatettu heraproteiinijauhe. Vahvalla kationinvaihtohartsilla vaiheessa a) naudan insuliinista puhdistetusta herasta valmistetussa heraproteiinijauheessa ei todettu lainkaan naudan insuliinia electro spray -massaspektrometrillä. Näin saatu oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus sopii sellaisenaankin esimerkiksi äidinmaidonkorvikkeiden ja muiden erityisravintovalmisteiden raaka-aineeksi, koska sen sisältämä heraproteiini on ravitsemuksellisesti erittäin korkealaatuista eikä tarvitse muita proteiineja ravintosisäilyksen täydentämiseksi.

Kationinvaihtohartsikäsitteily voidaan tehdä myös esimerkiksi rasvattomalle maidolle tai vesiliuoksena olevalle maidon kaseiinille, joka on edullinen proteiinivalmiste. Naudaninsuliinijäämä voidaan poistaa kaseiiniliuoksesta vastaavalla tavalla kuin maidosta. Heraproteiinia heikomman ravintoarvonsa vuoksi kaseiini ei kuitenkaan ole yhtä suositeltavaa äidinmaidonkorvikkeen yksinomaiseksi proteiinilähteeksi kuin heraproteiini.

Mikäli keksinnön mukaisen proteiinikoostumuksen naudaninsuliinipitoisuutta halutaan vielä alentaa, voidaan sen valmistukseen liittää entsymaattinen hydrolyysi ja mahdollisesti vielä hydrofobinen kromatografiakäsittely. Tällöin vaiheessa b) saadusta proteiinikonsentraatista tai proteiinijauheesta muodostetaan veteen liuos, jonka pitoisuus on 1 - 20 %, edullisesti noin 5 %. Liuoksen pH säädetään arvoon noin 8,5 esimerkiksi Ca(OH)_2 :lla ja lämpötila noin arvoon 50 °C, minkä jälkeen liuokseen lisätään eläin- tai mikrobiperäisiä entsyymejä, siten, että ne hydrolysoivat tehokkaasti erityisesti naudan insuliinin proteiiniketjun sidoksia. Tällaisia proteaaseja ovat mm. kymotrypsiini, subtilisiini Carlsberg -seriiniproteaasi, subtilisiini BPN' -seriiniproteaasi, Aspergillus oryzean serii- ja metalloproteaasit, papaiini, Bacillus subtilis

-neutraaliproteaasi, termolysiini, Streptomyces griseuksen seriini- ja metalloproteaasit, pepsiini, Endothica parasitican hapanproteaasi ja pankreatiini. Hydrolyysin annetaan jatkua 8 tunnin ajan. Hydrolyysissä naudan insuliini pilkkoutuu korkeintaan viiden aminohapon pituisiksi peptideiksi, jotka eivät aiheuta immuunivastetta eivätkä sisällä aiemman insuliinimolekyylin sisältämiä epitoppeja. Näin saatu hydrolyysiseos johdetaan pilkkoutumattomien suurikokoisten molekyylien poistamiseksi ultrasuodatukseseen tiheään ultrasuodatuskalvon läpi, joka sopivasti on 2 000 D cut-off -kalvo. Saatu permeaatti kuivataan esimerkiksi sumutuskuivauksella jauheeksi. Saadussa tuotteessa ei ole todettavissa naudan insuliinia.

Jos naudan insuliinin hydrolyysituotteet halutaan poistaa seoksesta mahdollisimman tarkasti, voidaan edellä saatu heraproteiinihydrolysaatti johtaa sopivasti 10 % liuoksena hydrofobiseen kromatografiakäsittelyyn, joka poistaa hydrolysaatista hydrofobiset peptidit ja niiden mukana mahdolliset naudan insuliinin hydrolyysituotteet.

Kyseinen kromatografiakäsittely voidaan tehdä sopivasti hydrofobisella adsorptiohartsilla, kuten Amberlite XAD-16 -hartsilla (Rohm & Haas, Ranska), mutta se voidaan tehdä myös aktiivihiilellä, joka myös pystyy poistamaan hydrofobisia yhdisteitä. Tuotantomittakaavassa kyseinen kromatografiakäsittely voidaan tehdä käytännöllisesti pylväässä, jonne pakatun adsorptiohartsin tai aktiivihiilen läpi käsiteltävä liuos johdetaan. Pylvään läpi tullut liuos otetaan talteen, haihdutetaan ja kuivataan jauheeksi. Näin saatu jauhe ei sisällä nyky menetelmillä havaittavia määriä naudan insuliinia. Tuotteen aminohappokoostumus on kuitenkin muuttunut jonkin verran hydrofobisten aminohappojen kohdalla, joten pieni määrä fenyylialaniinia ja tyrosiinia joudutaan lisäämään ravintovalmisteiden valmistuksen yhteydessä.

Edullisimmin naudan insuliini poistetaan lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, edullisesti herasta vahvalla kationinvaihtohartsilla, minkä jälkeen näin käsitelty nestemäinen proteiinipitoinen materiaali konsentroidaan ultra- ja diasuodatuksella. Mikrosuodatus esikäsittelynä on edullista, koska insuliini on usein tarttuneena makromolekyyliihin, kuten kaseiinipölyyn tai denaturoituneeseen heraproteiiniin, jotka voidaan poistaa sopivasti mikrosuodatuksen avulla. Mikäli em. menetelmillä ei ole saavutettu tuotteen riittävän alhaista naudaninsuliinipitoisuutta, sitä on mahdollista alentaa edelleen entsymaattisen hydrolyysin ja siihen mahdollisesti liitettävän hydrofobisen kromatografian avulla.

Äidinmaidonkorvikkeet koostetaan perinteisesti maidosta, kermasta, kasviöljystä, vähäsuolaisesta herajauheesta, kivennäisistä ja vitamiineista, joista maito, kerma ja vähäsuolainen herajauhe sisältävät naudan insuliinia. Heraproteiini on ravintoarvoltaan hyvin korkealuokkaista, joten se soveltuu ainoaksi proteiinilähteeksi äidinmaidonkorvikkeeseen ja muihinkin erityisravintovalmisteisiin.

Keksinnön mukaista oleellisesti insuliinitonta proteiinikoostumusta voidaan käyttää äidinmaidonkorvikkeen ja muidenkin erityisravintovalmisteiden proteiini-osaana sekä esimerkiksi kulutusmaidon raaka-aineena. Tällöin saadaan valmiste, joka ei sisällä naudan insuliinia, joten se ei myöskään aiheuta immunisoitumista naudan insuliinille eikä siten lisää riskiä sairastua IDDM:ään.

Keksinnön kohteena on siten myös oleellisesti insuliiniton äidinmaidonkorvike samoin kuin oleellisesti insuliiniton erityisravintovalmiste, joille on tunnusomaista, että niiden oleellisesti insuliiniton proteiini-osa on valmistettu lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvat-

tomasta maidosta tai kaseiiniliuoksesta, edullisesti kuitenkin herasta, sopivasti edellä kuvatulla tavalla.

Keksintöä kuvataan lähemmin seuraavissa esimerkeissä.

5

Esimerkki 1

6000 ml:n tuoretta juustoheraa pH laskettiin 10 % HCl:lla 5,4:ään. 300 ml vahvaa kationinvaihtohartsia (Amberlite C-20, Rohm & Haas, Ranska) pakattiin 300 ml:n laboratoriomitan pylvääseen ja regeneroitiin 600 ml:lla 17 % NaCl:a, jonka jälkeen pylväs huuhdottiin 1000 ml:lla vettä. Pylvään läpi ajettiin huoneenlämmössä 6000 ml juustoheraa (20 pylvääntilavuutta (BV)) nopeudella 6 BV/h. Ennen käsittelyä hera sisälsi 343 ng/ml insuliinia eli 68 mg insuliinia/kg todellista proteiinia, käsittelyn jälkeen herasta ei todettu lainkaan insuliinia eli pitoisuus aleni käsittelyssä 100 %. Heran kokonaisproteiinipitoisuus ei muuttunut merkittävästi käsittelyssä. Ennen käsittelyä proteiinipitoisuus oli 0,87 %, käsittelyn jälkeen 0,86 %. pH nostettiin 10 % NaOH:lla uudestaan 6,5:een, jonka jälkeen hera ultrasuodatettiin 10 000 D cut-off -kalvoilla ensin konsentroitisuhteella 10, sitten retentaatti laimennetaan lähtötilavuuteen ja suodatetaan uudelleen suhteella 12, jolloin kokonaiskonsentroitisuhteeksi tulee 120. Proteiinikonsentraatti pakkaskuivattiin 90 % proteiinia sisältäväksi jauheeksi.

25

Esimerkki 2

100 litraa 0,1 μ m mikrosuodatuskalvojen läpi suodatettua juustoheraa ultrasuodatetaan 10 000 D cut-off -kalvoilla ensin konsentroitisuhteella 10, sitten retentaatti laimennetaan lähtötilavuuteen ja suodatetaan uudelleen suhteella 12, jolloin kokonaiskonsentroitisuhteeksi tulee 120. Retentaatti sisälsi proteiinia 90 % kuiva-aineesta ja se sumutskuivattiin jauheeksi (kuivauslämmöt 180/75 °C). Käsittelemätön juustohera sisälsi insuliinia electro spray -massaspektrometrianalyysin mukaan 343 ng/ml

35

eli 68 mg/kg todellista proteiinia. Mikro-suodatettu hera sisälsi insuliinia 324 ng/ml eli 64 mg/kg todellista proteiinia. Ultra- ja diasuodatetussa heraproteiini-konsentraatissa insuliinipitoisuus oli 21 mg/kg todellista proteiinia massaspektrometrin mukaan eli pitoisuus aleni proteiiniin suhteutettuna n. 69 %. Perinteinen 70 - 80 % proteiinia sisältävä ultrasuodatettu heraproteiinijauhe sisältää insuliinia n. 60 mg/kg todellista proteiinia.

Esimerkki 3

100 litraa happokaseiinin valmistuksesta saatua happoheraa mikro-suodatettiin vastaavasti 0,1 μ m:n kalvojen läpi. Heran pH oli 4,5. Mikro-suodatettu hera ultra- ja diasuodatettiin vastaavasti kuin esimerkissä 1 siten, että kokonaiskonsentroidisuhteeksi tuli 120. Proteiinipitoisuus oli tällöin noin 90 % kuiva-aineesta. Käsittelemätön hera sisälsi insuliinia 320 ng/ml eli 48 mg/kg todellista proteiinia, mikro-suodatettu 295 ng/ml eli 45 mg/kg todellista proteiinia ja ultra- ja diasuodatetussa heraproteiini-konsentraatissa insuliinia oli 95 ng/ml eli 16 mg/kg todellista proteiinia massaspektrometrin mukaan määritettynä. Siten insuliinipitoisuus aleni käsittelyssä n. 67 %.

Esimerkki 4

60 litraan 50-asteista vettä liuotettiin 5,040 kg esimerkissä 1 valmistettua heraproteiinijauhetta, 11,423 kg kasvirasvaseosta, 11,232 kg glukoosia, 12,260 kg malto-dekstriiniä (DE 21), 135 g vitamiini- ja mineraaliesiseosta (sisältää A-, D-, E-, K-, B1-, B2-, B6-, B12-vitamiinit, niasiinin, foolihapon, pantoteenihapon, biotiinin, askorbiinihapon, koliinin, inositolin, ferroglukonaatin, sinkkisulfaatin, mangaanisulfaatin, natriumseleniitin, kupariglukonaatin) sekä 70 g kalsiumkloridia, 300 g kalsiumfosfaattia, 65 g magnesiumsulfaattia, 125 g natriumkloridia ja 620 g kaliumsitraattia. Seoksen kuiva-ainepitoisuus oli n. 40 %. Näin saatu seos johdettiin homogenisaattoriin (150/50 bar) ja kuivattiin jauheeksi sumu-

tuskuivaimella, jossa kuivauslämmöt olivat 180/75 °C, leijupedillä 70/120/30 °C. Tuote oli koostumukseltaan, ulkonäöltään ja maultaan tavallisen äidinmaidonkorvikeseoksen jauheen kaltaista.

5

Esimerkki 5

Esimerkissä 1 esitetty heraproteiinikonsentraatti laimennettiin 5 % pitoisuuteen vedellä. Liuos pastöroitiin 65 °C:ssa 20 min ajan ja jäähdytettiin 50 °C:een. pH säädettiin 8,5:een 10 % $\text{Ca}(\text{OH})_2$:lla. Seokseen lisättiin 6 %
 10 proteiinin määrästä pankreatiini (4 x USP, SPL, USA) - ja Alcalase 0,6 L -entsyymejä (Novo Industri A/S; Tanska). Hydrolyysin aikana seoksen pH:ta pidettiin 7,0:ssa $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -lisäysten avulla. Seoksen annettiin hydrolysoitua 8 tunnin ajan, jonka jälkeen seos lämpökäsiteltiin 5 min
 15 90 °C:ssa. Tämän jälkeen seos jäähdytettiin 50 °C:een ja ultrasuodatettiin 2000 D cut-off -kalvoilla ja permeaatti kerättiin talteen. Saatu permeaatti sumutuskuivattiin jauheeksi. Hydrolysaatista ei ollut todettavissa insuliinia.

Esimerkki 6

20

Esimerkissä 5 saatu hydrolysaatti liuotettiin 10 % liuokseksi. 30 ml Amberlite XAD-16 -hartsia (Rohm & Haas) pakattiin laboratoriomittakaavaiseen pylvääseen, joka regeneroitiin 60 ml:lla 4 % NaOH, huuhdeltiin 1000 ml:lla vettä ja regeneroitiin 60 ml:lla 4 % HCl:a ja huuhdeltiin
 25 vedellä kunnes läpitulleen veden pH oli yli 5. Hydrolysaattiliuosta ajettiin 1700 ml hartsipylvään läpi, mikä vastasi 567 g hydrolysaattikuiva-ainetta/100 ml hartsia. Läpitulnut liuos otettiin talteen ja pakkaskuivattiin jauheeksi. Hydrolysaatista ei ollut todettavissa insuliinia.
 30 Hydrolysaatti käytettiin maitoallergikoille tarkoitettun erityisravintovalmisteen yksinomaisena proteiininlähteenä.

Esimerkki 7

60 litraan 50-asteista vettä liuotettiin 8,670 kg
 35 esimerkin 6 mukaisesti valmistettua heraproteiinihydrolysaattijauhetta, 10,466 kg kasvirasvaseosta, 16,058 kg

glukoosia, 5,233 kg maltodekstriiniä (DE 21), 135 g vitamiini- ja mineraaliesiseosta (sisältää A-, D-, E-, K-, B1-, B2-, B6-, B12-vitamiinit, niasiinin, foolihapon, pantoteenihapon, biotiinin, askorbiinihapon, koliinin, inositolin, ferroglukonaatin, sinkkisulfaatin, mangaanisulfaatin, natriumseleniitin, kupariglukonaatin) sekä 10 g kalsiumkloridia, 320 g kalsiumfosfaattia, 70 g magnesiumsulfaattia, 165 g natriumkloridia ja 620 g kaliumsitraattia, 1 g L-tyrosiinia ja 2 g L-fenyylialaniinia. Seoksen kuiva-ainepitoisuus oli n. 40 %. Näin saatu seos johdettiin homogenisaattoriin (150/50 bar) ja kuivattiin jauheeksi sumutuskuivaimella, jossa kuivauslämmöt olivat 180/75 °C, leijupedillä 70/120/30 °C. Tuote oli koostumukseltaan, ulkonäöltään ja maultaan tavallisen esim. maitoallergikoille tarkoitettun erityisravintovalmisteen kaltaista.

Esimerkki 8

Vahva kationinvaihtopylväs (30 ml hartsia) regeneroitiin kuten esimerkissä 1. 600 ml:n rasvatonta maitoa pH säädettiin 5,4:ään. pH-säädetty maito ajettiin huoneenlämmössä pylvään läpi kuten esimerkissä 1, jolloin maidosta poistui osa kalsiumista, mutta myös huomattava osa insuliinista. RIA-analyysin mukaan (massaspekrometri ei ollut käytettävissä maidolle) käsittelemätön maito sisälsi naudan insuliinia 26 μ IU/ml ja käsitelty 17 μ IU/ml. Insuliinipitoisuus aleni käsittelyssä n. 35 %. Käsittely ei ollut riittävä insuliinin täydelliseen poistamiseen maidosta, mutta esimerkki kuvaa, että menetelmä sopii myös muiden maitoraaka-aineiden kuin heran käsittelyyn.

Esimerkki 9

Kationinvaihtohartsi (30 ml) regeneroitiin kuten esimerkissä 1. Natriumkaseinaatista valmistettiin 3 % liuos veteen. pH laskettiin 5,5:een laimealla HCl:lla. Kaseinaattiliuos pumpattiin kationinvaihtohartsin läpi huoneenlämmössä kuten maito esimerkissä 8. Ennen käsittelyä

kaseinaattiliuos sisälsi insuliinia RIA-analyysin mukaan
26 μ IU/ml ja käsitelty liuos 10 μ IU/ml. Insuliinipitoisuus
aleni käsittelyssä n. 62 %.

Patenttivaatimukset

1. Oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus,
t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu poistamalla
5 naudan insuliini lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvat-
tomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta,
rasvattomasta maidosta tai kaseiiniliuoksesta.

2. Menetelmä oleellisesti insuliinittoman prote-
iinikoostumuksen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä,
10 että

a) lehmänmaidosta peräisin oleva nestemäinen rasva-
ton proteiinipitoinen materiaali johdetaan insuliininpois-
tokäsittelyyn,

b) vaiheessa a) saatu nestemäinen proteiinipitoinen
15 materiaali

konsentroidaan ultra- ja diasuodattamalla käyttäen
kalvoja, jotka ovat 6 000 - 20 000 D cut-off -kalvoja,

saatu proteiinikonsentraatti haihdutetaan ja
mahdollisesti kuivataan proteiinijauheeksi,

c) mahdollisesti

1) vaiheessa b) saadusta proteiinikonsentraatista
tai proteiinijauheesta muodostetaan veteen liuos, jonka
proteiinipitoisuus on 1 - 20 %,

2) vaiheessa c1) saatu proteiiniliuos hydrolysoi-
daan entsyymaattisesti proteaaseilla ja

3) vaiheessa c2) hydrolysoitu proteiiniliuos ult-
rasuodatetaan, ja

d) mahdollisesti johdetaan vaiheessa c) saatu pro-
teiinihydrolysaatti hydrofobiseen kromatografiakäsittelyyn
ja

e) vaiheessa c) tai d) saatu liuos haihdutetaan ja
kuivataan jauheeksi.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) nestemäisenä
rasvattomana proteiinipitoisena materiaalina käytetään
35

heraa, rasvatonta maitoa tai kaseiiniliuosta, edullisesti heraa.

4. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) nestemäinen ras-
 5 vaton proteiinipitoinen materiaali, jonka pH on 5,2 - 5,6, johdetaan Na⁺- tai K⁺-muotoon regeneroidulla vahvalla kationinvaihtohartsilla täytetyn pylvään läpi.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) nestemäinen ras-
 10 vaton proteiinipitoinen materiaali kirkastetaan ennen kationinvaihtohartsikäsittelyä suodattamalla se mikrosuodatuskalvojen läpi, jotka kalvot ovat 0,05 - 1,4 mikrometrin kalvoja, edullisesti 0,1 mikrometrin kalvoja.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) nestemäinen ras-
 15 vaton proteiinipitoinen materiaali kirkastetaan ennen kationinvaihtohartsikäsittelyä käsittelemällä sitä ultrasuodatuskalvoilla, jotka edullisesti ovat 50 000 - 200 000 D cut-off -kalvoja.

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) nestemäinen ras-
 20 vaton proteiinipitoinen materiaali kirkastetaan ennen kationinvaihtohartsikäsittelyä sentrifugoimalla se edullisesti nopeudella 1 000 - 10 000 kierrosta / min.

8. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 7 mukainen me-
 25 netelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) ultra- ja diasuodatuksessa käytetään kalvoja, jotka ovat 10 000 D cut-off -kalvoja.

9. Jonkin patenttivaatimuksista 2 - 8 mukainen me-
 30 netelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) ultra- ja diasuodatetusta proteiinikonsentraatista muodostetaan vesiliuos, jonka pitoisuus on 1 - 20 %, edullisesti noin 5 %, ja joka hydrolysoidaan entsyymaattisesti proteaaseilla, kuten pankreatiini- ja alkalaasientsyymeillä.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että vaiheessa c) saatu proteiinihydrolysaatti johdetaan hydrofobiseen kromatografiakäsittelyyn, jolloin sitä käsitellään aktiivihielellä tai edullisesti hydrofobisella polystyreenipohjaisella adsorptiohartsilla.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiinikoostumus, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu jonkin patenttivaatimuksista 2 - 10 mukaisella menetelmällä.

12. Patenttivaatimuksen 1 tai 11 mukaisen proteiinikoostumuksen käyttö äidinmaidonkorvikkeen tai jonkin muun erityisravintovalmisteen proteiiniosana tai kulutusmaidon raaka-aineena.

13. Oleellisesti insuliiniton äidinmaidonkorvike, t u n n e t t u siitä, että sen proteiiniosa on valmistettu oleellisesti naudaninsuliinittomasta, lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvattomasta maidosta tai kaseiiniliuoksesta, edullisesti herasta.

14. Oleellisesti insuliiniton erityisravintovalmiste, t u n n e t t u siitä, että sen proteiiniosa on valmistettu oleellisesti naudaninsuliinittomasta, lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvattomasta maidosta tai kaseiiniliuoksesta, edullisesti herasta.

15. Menetelmä oleellisesti insuliinittoman äidinmaidonkorvikkeen tai jonkin muun erityisravintovalmisteen tai kulutusmaidon tai sen raaka-aineen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että sen proteiiniosana käytetään jonkin patenttivaatimuksista 2 - 10 mukaisesti valmistettua proteiinikoostumusta.

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena on-oleellisesti insuliiniton proteiinikoostumus, jolle on tunnusomaista että, se on valmistettu poistamalla naudan insuliini lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista, kuten herasta, rasvattomasta maidosta tai kaseiiniliuoksesta. Lisäksi keksinnön kohteena kyseisen proteiinikoostumuksen valmistus ja käyttö sekä sitä sisältävät valmisteet, kuten oleellisesti insuliinittomat äidinmaidonkorvikkeet ja muut erityisravintovalmisteet, ja näiden valmistus.

(ei kuvaa)

Kuva 1:

IgG-luokan vasta-ainetaso naudan insuliinia kohtaan 6 kuukauden ikäisillä lapsilla, jotka ovat saaneet pelkästään rintamaitoa tai lisäruokintana tavallista äidinmaitokorviketta (Enfamil®)

